

EXEMPLES D'ÉTUDES D'ORGANISMES PARASITES DES RACINES DANS DES CULTURES DE RACINES TRANSFORMÉES PAR *AGROBACTERIUM RHIZOGENES*

par Jacques MUGNIER*

RÉSUMÉ – Des racines transformées par *Agrobacterium rhizogenes* sont inocuées avec des organismes parasites des racines. Les réponses tactiques et tropiques et les modes de colonisation des parasites sont étudiés.

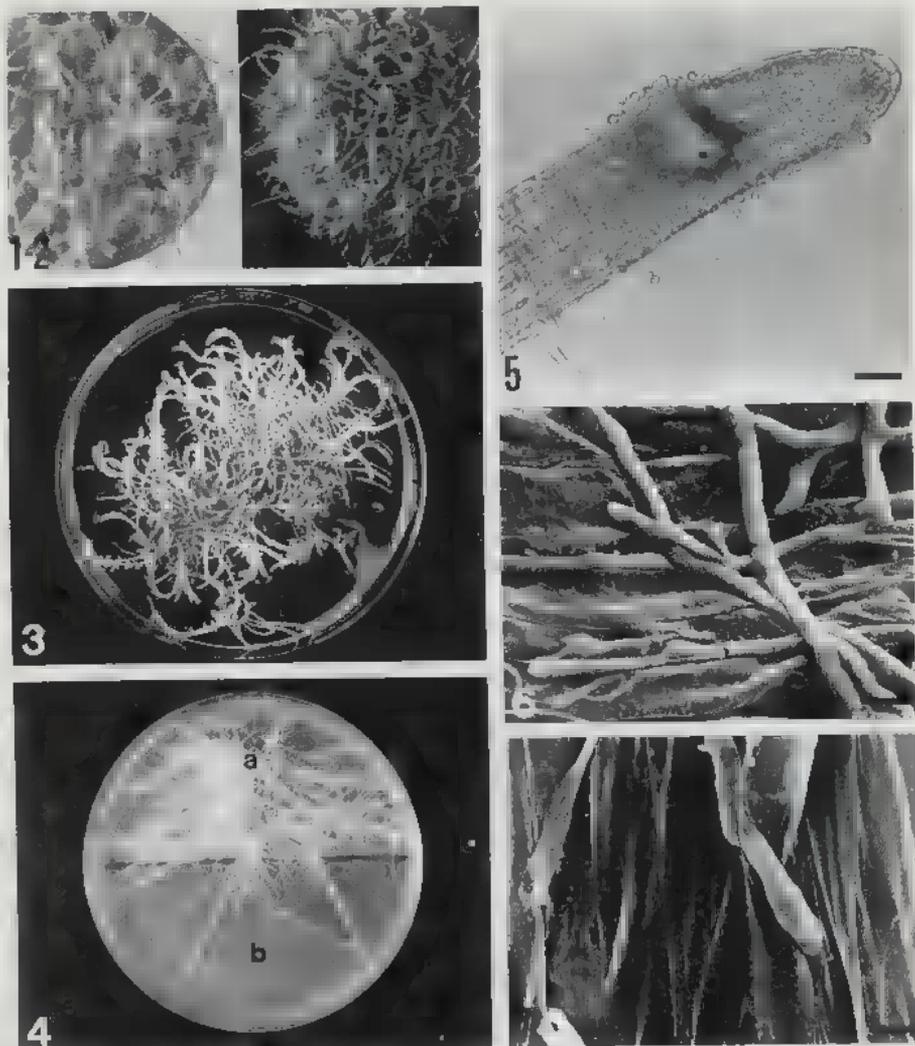
SUMMARY – Roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes* were inoculated with soil-borne parasites. Tactic and tropic responses and infection developed by the parasites were analysed.

MOTS CLÉS : racines transformées, *Agrobacterium rhizogenes*, parasites des racines.

LES RACINES DU HAIRY-ROOT

Le terme de «hairy-root» (chevelu racinaire) apparaît dans la littérature dès le début du siècle (HILDERBRAND, 1934) pour désigner le développement de masses de racines à la base des troncs de pommier. Le syndrome du hairy-root est causé par une bactérie du sol, *Agrobacterium rhizogenes* Riker, laquelle est capable d'infecter un grand nombre de dicotylédones (DE CLEENE & DE LEY, 1981). Le hairy-root est analogue sur de nombreux points avec la maladie du «crown-gall» causée par *Agrobacterium tumefaciens* (Sm. & Town.) Conn. Dans les deux cas, les bactéries possèdent un grand plasmide (le «root-inducing» plasmide chez *A. rhizogenes*) dont un segment, le T-DNA (ADN transféré), est intégré dans le génome des cellules de la plante infectée (CHILTON & al., 1982). Les cellules qui ont reçu le T-DNA se différencient en méristèmes racinaires (Fig.1, 2) et les racines induites peuvent se développer indéfiniment dans des milieux nutritifs stériles, sans l'addition d'hormones de croissance (TEPPER & TEMPÉ, 1981). Ce phénomène, bien qu'imparfaitement élucidé, est dû à la présence d'auxines endogènes, et d'autres précurseurs d'hormones, issus du produit de l'activité des gènes du T-DNA (WHITE & al., 1985).

* Rhône-Poulenc Agrochimie, 69263 Lyon Cédex 9, France.



Figures 1-2 — Symptôme du hairy sur les disques de racines de navet (1) et de panais (2) inoculés avec *Agrobacterium rhizogenes* (photo de ARK & THOMPSON, 1961; avec la permission de la Société Américaine de Phytopathologie).

Figures 1-2 — Hairy roots emerged from turnip (1) and parsnip (2) root disks inoculated with *Agrobacterium rhizogenes* (photo by ARK & THOMPSON, 1961; with the permission of the American Phytopathological Society).

Figure 3 — Racines transformées d'arachide (*Arachis hypogaea* L.) cultivées dans le milieu liquide de Murashige & Skoog (boîte de Pétri de 14 cm et 15 jours d'incubation).

Figure 3 — Transformed roots of peanuts (*Arachis hypogaea* L.) in the Murashige & Skoog liquid medium (Petri dish, 14 cm in diam., 15 days).

Les racines cultivées dans le milieu M & S de MURASHIGE & SKOOG (1962) possèdent les mêmes caractéristiques morphologiques que celles de racines normales. Elles ont des morphotypes très précis, du type à fines racines et nombreux poils absorbants, au type à grosses racines (MUGNIER, 1988a; Fig. 3).

De nombreux phénomènes physiologiques qui caractérisent des racines normales sont retrouvés dans les racines du hairy-root, comme la production d'alcaloïdes (HAMILL & al., 1987; FLORES & al., 1987) ou de polyacétylènes (thiophènes) impliqués dans les réactions d'élicitation (FLORES, 1987; FLORES & al., 1988).

LES CULTURES BICOMPARTIMENTÉES

Les essais d'infection des racines transformées sont réalisés dans des boîtes de Pétri bicompartmentées où le parasite n'est pas nourri par le milieu de culture des racines. Le système, illustré à la figure 4, est composé d'un compartiment *a* contenant le milieu M & S gélosé, et d'un compartiment *b* contenant de l'eau gélosée ou non. Les racines placées sur le milieu nutritif poussent par dessus la barrière séparant les deux compartiments et dans le compartiment *b* où les inoculum de parasites sont placés.

L'étude des associations est différente selon la nature des parasites; il peut s'agir d'un parasite obligatoire qui n'a jamais été cultivé au laboratoire sur milieu synthétique (Plasmodiophorales, mycorhizes à arbuscules et à vésicules) ou d'un parasite cultivé au laboratoire, comme par exemple *Pythium* ou *Rhizoctonia*.

Figure 4 – Racines transformées de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) dans une boîte de Pétri bicompartmentée (9 cm) après 6 jours d'incubation. Le compartiment *a* contient le milieu gélosé de Murashige & Skoog, et le compartiment *b* de l'eau gélosée.

Figure 4 – Six days growth of transformed roots of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in a 9 cm Petri dish. Compartment *a* contains the Murashige & Skoog agar medium, compartment *b* contains water agar.

Figure 5 – Agrégation de zoospores de *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp au niveau d'une blessure faite sur une racine transformée de muflier (*Antirrhinum majus* L.), 10 secondes après la blessure (Échelle = 0,2 mm).

Figure 5 – Masses of encysted zoospores of *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp at a wounding site of a transformed root of snapdragon (*Antirrhinum majus* L.), 10 seconds after the wounding (Scale = 0.2 mm).

Figures 6-7 – Infection d'une racine transformée de moutarde (*Brassica hirta* Moench) par *Rhizoctonia solani* groupe d'anastomose 2-1. 6. Développement des hyphes sur la surface de la racine. 7. Pénétration intercellulaire d'un hyphe (Échelle = 10 µm).

Figures 6-7 – Infection of a transformed root of mustard (*Brassica hirta* Moench) by *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2-1. 6. Hyphal growth on the root surface. 7. Hyphal penetration in a cell lumen (Scale = 10 µm).

LES PARASITES OBLIGATOIRES

La culture associée de champignons parasites obligatoires et aussi l'élevage de nématodes endoparasites sont présentés.

Les Plasmodiophorales

Les cycles de développement de *Plasmodiophora brassicae* Woron., l'agent de la hernie des Crucifères, et de *Polymyxa betae* Keskin, associé à la rhizomanie de la betterave à sucre, ne sont qu'imparfaitement connus, mais certains stades tels que les cystosores de *P. betae* sont facilement reconnaissables.

Les cystosores ont été observés dans les tissus de racines transformées de betteraves inoculées par *P. betae* (MUGNIER, 1987; YACCOUB, 1987).

Les champignons mycorhiziens à arbuscules et à vésicules

Ces champignons, plus généralement qualifiés de symbiotes obligatoires, sont capables de mycorhizer les racines transformées (MUGNIER & MOSSE, 1987; BECARD & FORTIN, 1988).

Les nématodes endoparasites

PAUL & al. (1988) réussissent l'élevage d'*Heterodera schachtii* Schmidt dans des cultures de racines transformées de betterave à sucre et MUGNIERY (comm. pers.) celui de *Meloidogyne* spp. et de *Globodera* spp. dans des cultures de racines transformées de leurs hôtes respectifs. Des expériences similaires ont été effectuées avec *H. schachtii* et *M. incognita* dans des cultures de racines transformées (MUGNIER, 1988b).

LES AGENTS DES NÉCROSES RACINAIRES ET DES FONTES DE SEMIS

Les espèces de champignons pathogènes les plus fréquemment isolées des racines ou des collets de plantes malades, et cultivées sur des milieux nutritifs, appartiennent aux genres *Fusarium*, *Pythium* et *Rhizoctonia*.

Pythium et autres Pythiaceae produisant des zoospores

Les zoospores de *Pythium* et aussi d'*Aphanomyces* et de *Phytophthora*, inoculées à des racines transformées de leurs hôtes répondent à un stimulus chémotactique émis par la racine transformée. Elles nagent vers les zones d'exudation situées au niveau de la zone d'élongation derrière l'apex et de la zone où émerge une racine latérale, s'y accumulent puis s'y enkystent. La réponse chémotactique est aussi obtenue par une blessure faite sur la racine (Fig. 5). Un tube germinatif émerge de la zoospore enkystée et forme sur l'épiderme de la racine un appressorium par lequel le champignon pénètre à l'intérieur des tissus.

Fusarium oxysporum

Les tests d'infection de racines transformées par des *Fusarium oxysporum*, agents des vascularioses, ont été réalisés avec des racines de *Dianthus caryophyll-*

lus L., *Lycopersicon esculentum* Mill., *Cucumis sativus* L., *Tagetes erecta* L., *Linum grandiflorum* Desf. inoculées respectivement avec les formes spéciales de *F. oxysporum*, *dianthi*, *lycopersici*, *melonis*, *callistephi* et *lini*. Dans tous les cas, aucun tube germinatif ou hyphes des différentes formes spéciales n'a infecté un poil absorbant ou l'épiderme des racines, et par conséquent les tissus vasculaires. La raison de la résistance des racines transformées à *F. oxysporum* n'est pas connue.

Rhizoctonia solani

L'espèce regroupe treize formes intraspécifiques, classées selon leur groupe d'anastomose (AG), leur spécificité d'hôte et la morphologie des cultures (OGOSHI, 1987). La forme parfaite (*Thanatephorus cucumeris* Frank) est obtenue au laboratoire (MUGNIER & CAMPOROTA, 1988).

Les différentes formes intraspécifiques, et aussi des cultures issues de basidiospores, ont été inoculées à des racines transformées de leurs hôtes respectifs. Par exemple, des isolats AG 2-1 ont été inoculés à des racines de Crucifères, AG 2-2 à des racines de betterave, AG 3 à des racines de pomme de terre, AGs 1 et 4 à différentes espèces de racines transformées. Le processus de l'infection des racines est celui observé dans des infections naturelles, et est composé par les phases suivantes :

1. croissance végétative du mycélium,
2. développement d'hyphes à la surface de la racine (Fig. 6).
3. formation d'appressoria simples ou lobés, et éventuellement de coussinets d'infection,
4. pénétration intercellulaire (Fig. 7),
5. colonisation inter- et intra cellulaire des tissus.

Toutes ces phases sont observées pour les cultures hétérokaryotiques et les cultures dérivées de basidiospores quand elles sont associées à une racine-hôte réceptive. Par contre, quand *R. solani* est inoculé à des racines non hôtes, le processus de l'infection est arrêté à une des phases pré-infectives 1 ou 2.

Ces quelques exemples montrent que les cultures de racines transformées permettent d'étudier, dans des boîtes de Pétri, le développement d'infections réussies par des parasites du sol. Elles offrent aussi la possibilité d'étudier d'autres aspects physiologiques et nutritionnels des systèmes racinaires, afin d'apporter des réponses aux problèmes qui leur sont posés dans le sol.

BIBLIOGRAPHIE

- ARK P.A. and THOMPSON J.P., 1961 — Detection of hairy root pathogen, *Agrobacterium rhizogenes*, by the use of fleshy roots. *Phytopathology* 51 : 69-71.
- BECARD G. and FORTIN J.A., 1988 — Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.* 108 : 211-218.

- CHILTON M., TEPFER D., PETIT A., DAVID C., CASSE-DELBART F. and TEMPÉ J., 1982 - *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genome of the host plant root cells. *Nature (London)* 295 : 432-434.
- DE CLEENE M. and DE LEY J., 1981 - The host range of infectious hairy-root. *Bot. Rev. (Lancaster)* 47 : 147-194.
- FLORES H.E., 1987 - Use of plant cells and organ culture in the production of biological chemicals. In : LE BARON H., MUMMA R.O., HONEYCUTT, DUESING J.H., PHILLIPS J.F. & HAAS M.J., *Biotechnology in Agricultural Chemistry*. Washington D. C., American Chemical Society, Symposium 334 : 66-86.
- FLORES H.E., HOY M.W. and PICKARD J.J., 1987 - Secondary metabolites from root cultures. *Trends Biotechnol.* 5 : 64-69.
- FLORES H.E., PICKARD J.J. and HOY M.W., 1988 - Production of polyacetylenes and thiophenes in heterotrophic and photosynthetic root cultures of Asteraceae. In : LAM J. & BRETELER H., *Naturally Occurring Acetylenes and Related Compounds*. Amsterdam, Elsevier (in press).
- HAMILL J.D., PARR A.J., RHODES M.J.C., ROBINS R.J. and WALTON N.J., 1987 - New routes to plant secondary products. *Biotechnology* 5 : 800-804.
- HILDERBRAND E.M., 1934 - Life history of the hairy-root organism in relation to its parthenogenesis on nursery apple trees. *J. Agric. Res.* 10 : 857-885.
- MUGNIER J., 1987 - Infection by *Polymyxa betae* and *Plasmodiophora brassicae* of roots containing root-inducing transferred DNA of *Agrobacterium rhizogenes*. *Phytopathology* 77 : 539-542.
- MUGNIER J. and MOSSE B., 1987 - Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in transformed root-inducing T-DNA roots grown axenically. *Phytopathology* 77 : 1045-1050.
- MUGNIER J., 1988a - Establishment of new axenic hairy root lines by inoculation with *Agrobacterium rhizogenes*. *Pl. Cell Reports* 7 : 9-19.
- MUGNIER J., 1988b - Transport of the nematicide oxamyl in roots transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Ann. Appl. Nematol.* (in press).
- MUGNIER J. et CAMPOROTA P., 1988 - La formation d'homokaryons et d'hétérokaryons et les facteurs d'incompatibilité chez *Thanatephorus cucumeris* groupe d'anastomose un. *Cryptogamie, Mycol.* (soumis).
- MURASHIGE T. and SKOOG F., 1962 - A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Pl.* 15 : 473-497.
- OGOSHI A., 1987 - Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Annual Rev. Phytopathol.* 25 : 125-143.
- PAUL H., ZIJLSTRA C., LEEUWANGH J.E., KRENS F.A. and HUIZING H.J., 1988 - Reproduction of the beet cyst nematode *Heterodera schachtii* Schm. on transformed root cultures of *Beta vulgaris* L. *Pl. Cell Reports* 6 : 379-381.
- TEPFER D. et TEMPÉ J., 1981 - Production d'agropine par des racines formées sous l'action d'*Agrobacterium rhizogenes*, souche A₄. *Compt. Rend. Hébd. Séances Acad. Sci.* Sér. III, 292 : 153-156.
- WHITE F.F., TAYLOR B.H., HUFFMAN G.A., GORDON M.P. and NESTER E.W., 1985 - Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Bacteriol.* 164 : 33-44.
- YACOUB A., 1987 - Culture *in vitro* de *Polymyxa betae* en association avec des racines de betterave transformées par *Agrobacterium rhizogenes*. Thèse 3ème cycle, INA Paris Grignon.